



<https://doi.org/10.29326/2304-196X-2024-13-3-223-233>
УДК 619:578.833.31:616-076:577.2

Разработка и валидация высокочувствительного метода мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ для обнаружения генома вируса классической чумы свиней

А. С. Садчикова¹, А. С. Иголкин¹, Р. С. Чернышев¹, А. А. Козлов¹, И. С. Колбин¹, А. В. Спрыгин¹, Д. А. Бирюченков¹, И. А. Чвала¹, А. Мазлум²

¹ ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), мкр. Юрьевец, г. Владимир, 600901, Россия

² Университет штата Луизиана, г. Батон-Руж, LA 70803, США

РЕЗЮМЕ

Проблема классической чумы свиней в свиноводстве по-прежнему остается актуальной во всем мире, несмотря на принимаемые меры. Последний случай данного заболевания в Российской Федерации регистрировали в 2020 г., однако сохраняется угроза эмерджентного возникновения болезни. Для предотвращения заноса вируса классической чумы свиней и быстрой ликвидации потенциально возможных вспышек необходимо проведение комплекса противозoonотических мероприятий, преимущественно включающих вакцинопрофилактику и ежегодный диагностический мониторинг на основе молекулярно-генетических и серологических исследований. В связи с этим разработан метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени с использованием внутреннего контрольного образца. Праймеры в модификации Locked Nucleic Acid (конформационно блокированных нуклеозидов), обеспечивающие более высокий уровень аффинности к ДНК-матрице и физико-химической стабильности, и FAM-меченый TaqMan-зонд были подобраны к 5'-нетранслируемой области генома. Также определены валидационные показатели: правильность, сходимость, воспроизводимость, специфичность и чувствительность. С целью сравнительного анализа чувствительности параллельно тестировались зашифрованными тест-системами № x1, x2 образцы смывов, органов и тканей, полученных от свиней, экспериментально зараженных эпизоотическим штаммом вируса классической чумы свиней (селезенка, почка, печень, кровь, лимфатические узлы, ректальные и оральные мазки), корма, контаминированного животными, и вирусосодержащего материала с известными титрами. Показаны 100%-я диагностическая чувствительность и предел детекции в 0,23 Ig ККИД₅₀/см³ разработанного метода. При этом показатели тест-систем № x1 и x2 были ниже, что может приводить к ложноотрицательным результатам полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ) и влиять на недостоверную постановку диагноза. Таким образом, представленный метод может использоваться при проведении широкомасштабного мониторинга классической чумы свиней в Российской Федерации.

Ключевые слова: классическая чума свиней, ОТ-ПЦР-РВ, внутренний контрольный образец, диагностическая чувствительность, аналитическая чувствительность

Благодарности: Работа выполнена за счет средств ФГБУ «ВНИИЗЖ» в рамках тематики научно-исследовательских работ «Ветеринарное благополучие». Авторы выражают глубокую благодарность заведующему лабораторией профилактики бактериальных болезней канд. вет. наук В. А. Евграфовой и ведущему биологу референтной лаборатории болезней крупного рогатого скота А. О. Кротовой за консультативную помощь.

Для цитирования: Садчикова А. С., Иголкин А. С., Чернышев Р. С., Козлов А. А., Колбин И. С., Спрыгин А. В., Бирюченков Д. А., Чвала И. А., Мазлум А. Разработка и валидация высокочувствительного метода мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ для обнаружения генома вируса классической чумы свиней. *Ветеринария сегодня*. 2024; 13 (3): 223–233. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2024-13-3-223-233>

Конфликт интересов: Иголкин А. С. и Чвала И. А. являются членами редколлегии журнала «Ветеринария сегодня», но не имеют никакого отношения к решению опубликовать эту статью. Рукопись прошла принятую в журнале процедуру рецензирования. Об иных конфликтах интересов авторы не заявляли.

Для корреспонденции: Садчикова Анастасия Сергеевна, аспирант, ветеринарный врач референтной лаборатории по африканской чуме свиней ФГБУ «ВНИИЗЖ», мкр. Юрьевец, г. Владимир, 600901, Россия, sadchikova@ariah.ru

Development and validation of highly sensitive multiplex real-time RT-PCR assay for detection of classical swine fever virus genome

Anastasiya S. Sadchikova¹, Alexey S. Igolkin¹, Roman S. Chernyshev¹, Anton A. Kozlov¹, Ivan S. Kolbin¹,
Alexander V. Sprygyn¹, Dmitriy A. Biryuchenkov¹, Ilya A. Chvala¹, Ali Mazloun²

¹ Federal Centre for Animal Health, Yur'evets, Vladimir 600901, Russia

² Louisiana State University, Baton Rouge, LA 70803, USA

ABSTRACT

Classical swine fever (CSF) remains a challenge for pig farming industry all over the world despite the measures taken. The last CSF case in the Russian Federation was reported in 2020, however, the threat of the disease emerging still persists. A set of anti-epidemic measures including mainly preventive vaccination and

annual diagnostic monitoring using molecular-genetic and serological methods is required for CSF virus introduction prevention and rapid eradication of potential disease outbreaks. Therefore, a real-time reverse transcription-polymerase chain reaction using an internal control sample has been developed. Therefore, a real-time reverse transcription-polymerase chain reaction using an internal control sample has been developed. Modified primers (locked nucleic acids containing conformationally blocked nucleosides) providing a higher affinity to the DNA matrix and physicochemical stability and a FAM-labeled TaqMan probe were selected for 5'-untranslated region of the genome. The following validation parameters were defined: accuracy, repeatability, reproducibility, specificity and sensitivity. For comparative analysis of the developed assay sensitivity, swabs, samples of organs and tissues collected from pigs experimentally infected with an epizootic strain of the classical swine fever virus (spleen, kidney, liver, blood, lymph nodes, rectal and oral smears), animal-contaminated feed and virus-containing material with known virus titres were also tested in parallel with coded test systems No. x1 and x2. The developed assay was shown to have 100% diagnostic sensitivity and detection limit of 0,23 lg CCID₅₀/cm³. Therewith, the results of analysis of test systems No. x1, x2 based on above parameters were lower that could give rise to false positive real-time RT-PCR results and incorrect diagnosis. Thus, described assay can be used for extensive monitoring of classical swine fever in the Russian Federation.

Keywords: classical swine fever, real-time RT-PCR, internal control sample, diagnostic sensitivity, analytical sensitivity

Acknowledgements: The study was funded by the FGBl "ARRIAH" as a part of research activities "Veterinary Welfare". The authors express their gratitude to V. A. Evgrafova, Cand. Sci. (Veterinary Medicine), Head of Laboratory for Bacterial Disease Prevention, and A. O. Krotova, Leading Biologist, Reference Laboratory for Cattle Diseases, for advisory assistance.

For citation: Sadchikova A. S., Igolkin A. S., Chernyshev R. S., Kozlov A. A., Kolbin I. S., Sprygin A. V., Biryuchenkov D. A., Chvala I. A., Mazloum A. Development and validation of highly sensitive multiplex real-time RT-PCR assay for detection of classical swine fever virus genome. *Veterinary Science Today*. 2024; 13 (3): 223–233. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2024-13-3-223-233>

Conflict of interests: Igolkin A. S. and Chvala I. A. are members of the editorial board of the "Veterinary Science Today" journal, none of the authors were involved into decision making process related to the article publication. Before being published, the manuscript has been appropriately reviewed. The authors did not declare any other conflicts of interests.

For correspondence: Anastasiya S. Sadchikova, Postgraduate Student, Veterinarian, Reference Laboratory for African swine fever, Federal Centre for Animal Health, Yur'evets, Vladimir 600901, Russia, sadchikova@arriah.ru

ВВЕДЕНИЕ

Классическая чума свиней (КЧС, *Pestis suum*) – одна из основных вирусных болезней, оказывающих значительное влияние на развитие свиноводства и охотничьего промысла дикого кабана [1].

Возбудителем КЧС является *Pestivirus C* рода *Pestivirus* семейства *Flaviviridae*, геном которого представлен одноцепочечной РНК положительной полярности длиной 12,3 т. н. [2]. Молекула РНК содержит две нетранслируемые области (5'-NTR и 3'-NTR), а также одну рамку считывания, кодирующую 13 белков (4 структурных и 9 неструктурных) [3].

Согласно рекомендациям Всемирной организации здравоохранения животных (ВОЗЖ), КЧС подлежит нотификации [4]. И несмотря на ликвидацию КЧС в европейских странах и России, где последняя вспышка регистрировалась в 2019 г. среди домашних свиней и в 2020 г. в популяции дикого кабана, угроза эмерджентного трансграничного заноса остается, что требует систематического надзора за заболеванием [5]. Ввиду отсутствия достоверных данных по количеству проведенного пассивного серологического мониторинга доказать циркуляцию вирулентного вируса КЧС в популяции дикого кабана на территории России затруднительно [6].

В настоящее время метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) широко используется как один из самых быстрых, специфичных и чувствительных методов в молекулярной биологии, нацеленных на обнаружение генетического материала возбудителей болезней [7]. Однако метод классической ПЦР с электрофоретической детекцией в агарозном геле – долгий и трудоемкий, несущий высокий риск перекрестной контаминации [8]. Для диагностики КЧС, в том числе скринингового мо-

нитинга, наиболее подходит мультиплексная полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ) с внутренним контрольным образцом (ВКО), снижающим вероятность недостоверных результатов [9].

Зонды TaqMan, позволяющие проводить гибридационно-флуоресцентную детекцию результатов ПЦР в режиме реального времени, как одни из самых практичных и надежных для диагностики пестивиральных инфекций, используются в ряде протоколов [10]. Большинство тест-систем на основе ОТ-ПЦР-РВ, описанных ранее для обнаружения генома вируса КЧС, амплифицируют фрагмент 5'-нетранслируемой области (5'-NTR) и демонстрируют приемлемую чувствительность и специфичность [11]. Более высокий уровень аффинности праймеров к ДНК-мишени и физико-химической стабильности достигается модификацией олигонуклеотидов в LNA (locked nucleic acid) [12].

Использование экзогенного ВКО дает возможность избежать ложноотрицательных результатов, возникающих вследствие ошибок как на стадии пробоподготовки (выделение нуклеиновой кислоты), так и амплификации целевого фрагмента [13].

Цель этого исследования заключалась в разработке и валидации высокочувствительного, специфичного и воспроизводимого протокола мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ с ВКО, релевантного для диагностики всех субгенотипов вируса КЧС, циркулировавших на территории Российской Федерации (1.1, 1.2, 2.1, 2.3) в период с 1982 по 2020 г. [5, 14]. Такой метод должен обладать характеристиками, удовлетворяющими всем требованиям для тест-системы на основе ПЦР-РВ, и возможностью широкого применения в диагностическом мониторинге инфекции [15].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вирусы и бактерии. Для разработки методики использовали разные штаммы вируса КЧС: референтный «Ши-мынь», «684», «719» (субгенотип 1.1), вакцинный «СК» (субгенотип 1.2), «CSF Amur 19-10/WB-12555» и «CSF Tigrovoe 16/WB-634» (субгенотип 2.1), «275» (субгенотип 2.2), «368», «870», «843» (субгенотип 2.3) и штаммы с неопределенным генотипом «589», «924», «925», «929», «917», «918», «920», «926», «927», «930» вируса КЧС, выделенные в России в период с 1982 по 2020 г.

Для определения аналитической специфичности метода использовали гетерологичные возбудители болезней свиней: вакцинный штамм «ВК»-ДЕП вируса болезни Ауески; штамм «Иркутский 2007» американского вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней (PPRC); референс-штамм «Мозамбик-78» V генотипа вируса африканской чумы свиней (АЧС); изолят «Челябинск 2021» вируса диареи крупного рогатого скота II генотипа (ВД КРС), полевой изолят возбудителя рожи свиней *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Патогенный биологический агент получен в форме лиофилизированного материала из государственной коллекции штаммов микроорганизмов и рабочей коллекции ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»).

Животные. Для получения первичной культуры клеток использовали подсосунков массой 10–15 кг в возрасте 2–2,5 мес. из благополучных по КЧС хозяйств Владимирской области. Эвтаназию и отбор эксплантата тестикул производили в соответствии с требованиями Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22.09.2010 по охране животных, используемых в научных целях.

Культивирование. Вирус КЧС накапливали в первично трипсинизированной культуре клеток тестикул свиней (ТС), культивируемой на среде Игла-МЕМ, приготовленной по прописи ФГБУ «ВНИИЗЖ», с добавлением 10% фетальной сыворотки крови КРС и 50 мкг/см³ гентамицина сульфата [16]. Идентификацию репродукции возбудителя проводили в ОТ-ПЦР-РВ согласно методическим рекомендациям².

Внутренний контрольный образец. В качестве ВКО выбран РНК-содержащий бактериофаг MS2 семейства *Leviviridae*, патогенный для *Escherichia coli* [17].

Дизайн праймеров и зондов. Выравнивание и сравнительный молекулярно-генетический анализ нуклеотидных последовательностей кДНК различных субгенотипов вируса КЧС, импортированных из базы данных GenBank, осуществляли с использованием программы Bioedit v7.2.5 и NCBI: Nucleotide BLAST. Критерием выбора оптимальных праймеров служили консервативные участки генома вируса КЧС. Праймеры и зонд для амплификации и гибридизации фрагмента ВКО выбраны исходя из литературных данных [18]. Синтез олигонуклеотидов выполнялся в компании ООО «Синтол» (Россия).

Выделение нуклеиновых кислот. РНК вируса КЧС экстрагировали из культуральной вирусосодержащей

суспензии ТС, а геном гетерологичных вирусов и бактерий – из лиофилизата нуклеосорбционным методом с использованием набора реагентов для выделения ДНК/РНК из биологического материала «РИБО-сорб» (ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Россия) в соответствии с инструкциями производителя³.

Постановка ОТ-ПЦР-РВ. Реакционная ПЦР-смесь содержала компоненты от производителя НПО «Евроген» (Россия), а именно набор OneTube RT-PCR TaqMan, включающий смесь OneTube RT-PCRmix, ревертазу TM-MMLV и воду, свободную от нуклеаз. Все стадии ПЦР (обратную транскрипцию, собственно амплификацию и гибридизационно-флуоресцентную детекцию) проводили в автоматическом амплификаторе Rotor-Gene Q в комплекте с программным обеспечением (QIAGEN, Германия).

Положительный контрольный образец (ПКО). В качестве ПКО предложен вакцинный штамм «СК» вируса КЧС с титром не менее 3,5 lg ККИД₅₀/см³ в форме лиофилизированного материала, растворенного в 4,0 см³ физиологического раствора и инактивированного термическим методом путем нагревания в течение 60 мин при температуре +60 °С. Полноту инактивации проверяли методом трех последовательных слепых пассажей в культуре клеток ТС согласно методическим рекомендациям¹.

Отрицательный контрольный образец (ОКО). В качестве ОКО использовали воду, свободную от нуклеаз, производства НПО «Евроген» (Россия).

Валидация. Валидационные параметры определялись согласно рекомендуемому руководству по публикации результатов разработки количественных ПЦР-РВ-протоколов (MIQE: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) [19]. Для определения правильности, сходимости и воспроизводимости анализировали положительный на наличие вируса КЧС штамма «719» образец: в 6 повторяемых реакциях, в 3 параллельных испытаниях в течение дня одним исследователем и в 3 параллельных испытаниях в течение 3 дней двумя исследователями. Аналитическую чувствительность (предел детекции) вычисляли в 10-кратных разведениях вируса КЧС штаммов «719», «684», «Ши-мынь» с известным титром. Показатель предела детекции выражали в минимальном титре вируса (lg ККИД₅₀/см³), обнаруженном валидируемым методом. Эффективность амплификации вычисляли согласно формуле:

$$E = (10^{1/\text{slope}} - 1) \times 100\%,$$

где slope – это значение наклона линейной области зависимости Ct от логарифма концентрации кДНК-матрицы.

Проверку аналитической специфичности выполняли в реакции ОТ-ПЦР-РВ с заведомо отрицательными на наличие РНК вируса КЧС образцами, содержащими экстрагированный геном гетерологичных вирусов и бактерий, а также с образцами штаммов вируса КЧС различных субгенотипов. Для определения диагностической чувствительности готовили панель с 27 истинно

² Колбин И. С., Власова Н. Н., Иголкин А. С., Елсукова А. А., Гаврилова В. Л., Пузанкова О. С. Методические рекомендации по выделению вируса классической чумы свиней на первичных культурах клеток (СС, КМС, СП, ТЯ, ТС) с идентификацией возбудителя методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени: утв. ФГБУ «ВНИИЗЖ» 14.09.2021 № 42-21. Владимир: ФГБУ «ВНИИЗЖ»; 2021. 56 с.

³ Инструкция по применению комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-сорб»: утв. приказом Росздравнадзора от 20.02.2009 № 1337-Пр/09. <https://www.amplisens.ru/upload/iblock/259/RIBO-sorb.pdf>

положительными образцами (селезенка, печень, почка, кровь, лимфатические узлы, мышечная ткань, ректальные и оральные мазки), полученными на разных стадиях протекания инфекционного процесса у экспериментально зараженных эпизоотическим штаммом вируса КЧС свиней, а также образцами корма, контаминированного инфицированными животными. Показатель диагностической специфичности определяли путем исследования 27 заведомо отрицательных образцов полнорационного комбикорма для свиней, 10%-х суспензий селезенки, почек, печени, лимфатических узлов, мясных изделий свиного происхождения, цельной крови, оральных и ректальных смывов свободных от КЧС свиней, полученных в референтной лаборатории по африканской чуме свиней ФГБУ «ВНИИЗЖ» в рамках реализации государственного эпизоотологического мониторинга и проведения исследований на коммерческой основе со свиноводческими хозяйствами европейской части России. Сравнительная оценка как диагностической, так и аналитической чувствительности проводилась в параллельном исследовании образцов зашифрованными отечественными тест-системами № x1 и x2 согласно инструкции производителей. Выбранные тест-системы наиболее востребованы в России для диагностики КЧС и, так же как и исследуемая тест-система, содержат ВКО.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программы Microsoft Excel. Построение графиков выполнялось в программе GraphPad Prism.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Дизайн олигонуклеотидов. По результатам выравнивания и сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей штаммов различных субгенотипов вируса КЧС наиболее консервативной областью генома, как и ожидалось, оказалась 5'-NTR, к которой и были подобраны прямой и обратный праймеры в модификации LNA, амплифицирующие фрагмент в 120 нуклеотидов (рис. 1).

TaqMap-зонды к целевому фрагменту генома вируса КЧС мечены флуорофором 6-FAM (6-карбоксифлуоресцеин), а к участку ВКО – флуорофором Cy5.5 (цианин-5.5).

Оптимизация условий ОТ-ПЦР-РВ. В процессе оптимизации определены температурно-временной профиль и количественный состав ПЦР-смеси.

Смесь на одну реакцию содержала 1X OneTube RT-PCRmix, 0,4 пмоль прямого (forward) и 0,4 пмоль обратного (reverse) праймеров, 0,2 пмоль TaqMap-зонда, специфичных к фрагменту вируса КЧС; по 0,1 пмоль прямого, обратного праймеров и TaqMap-зонда, специфичных к участку ВКО, 1X TM-MMLV ревертазы, 10,0 мкл РНК-матрицы. До конечного объема реакционной смеси 25,0 мкл добавлялась вода, свободная от нуклеаз.

Программа ПЦР включала в себя обратную транскрипцию при 50 °C в течение 25 мин и амплификацию с двойным циклированием: общую денатурацию с целью инактивации ревертазы и активации ДНК-полимеразы с «горячим стартом» при 95 °C в течение 10 мин, первые 10 циклов без детектирования флуоресценции (денатурация при 95 °C в течение 10 с, отжиг праймеров при 60 °C в течение 40 с, элонгация при 72 °C в течение 10 с), затем 35 циклов с детектированием флуоресценции на каналах Green и Crimson (денатурация при 95 °C в течение 10 с, отжиг праймеров при 55 °C в течение 40 с, элонгация при 72 °C в течение 10 с).

Выбор и оптимизация концентрации ВКО. В диагностике болезней, вызываемых РНК-содержащими вирусами (гепатит С, синдром приобретенного иммунитета человека и т. д.), в качестве ВКО используется бактериофаг MS2. Фаг семейства *Leviviridae* представляет собой небольшой вирион с икосаэдрическим типом симметрии, патогенный для *Escherichia coli*. Геном представлен 3569 нуклеотидами одноцепочечной РНК [20]. Основаниями для выбора MS2 как ВКО являются РНК-геном и безвредность для людей, животных, растений [21].

С целью определения достаточной концентрации ВКО для добавления в систему экстракции РНК проведено тестирование образцов интактной культуры клеток ТС, 10%-й суспензии селезенки зараженных эпизоотическим штаммом возбудителя и свободных от КЧС свиней, культурального вируса КЧС штамма «719» и ОКО с различным содержанием бактериофага MS2 в пробе (табл. 1).

В результате оптимальное количество ВКО составило $3,2 \times 10^3$ БОЕ бактериофага MS2 на 100 мкл пробы. В ходе оценки хранения суспензии MS2 с рекомендуемым титром при температуре +4 °C выяснили, что через шесть месяцев данный материал в ОТ-ПЦР-РВ имел стабильный пороговый цикл амплификации (Ct) с изме-



Рис. 1. Выравнивание геномных последовательностей 5'-нетранслируемой области (5'-NTR) различных штаммов вируса КЧС, импортированных из GenBank (оранжевым цветом обозначены области отжига прямого и обратного праймеров, зеленым цветом – область гибридизации TaqMap-зонда)

Fig. 1. Alignment of CSF virus genome 5'-untranslated region (5'-NTR) sequences obtained from the GenBank (forward and reverse primer annealing sites are given in orange, TaqMan probe hybridization region is given in green)

нениями ± 2 Ct. При проведении пяти циклов заморозки материала при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ и оттаивания при комнатной температуре Ct оставался стабильным.

Оценка правильности, сходимости и воспроизводимости. В результате исследования установлены 100%-е показатели правильности, сходимости и воспроизводимости валидируемого метода, так как заведомо положительный на наличие вируса КЧС штамма «719» образец в 6 повторяемых реакциях, в 3 параллельных испытаниях в течение дня одним исследователем и в 3 параллельных испытаниях в течение 3 дней двумя исследователями показал положительные результаты (табл. 2).

Однако, как обозначено на графике (рис. 2), на третий день испытания одного и того же образца значение Ct увеличивалось на $3,09 \pm 0,81$ в сравнении со вторым днем у обоих исследователей, что может быть связано с многократным замораживанием и оттаиванием вирусодержащего материала.

Определение аналитической чувствительности. Установлен средний показатель минимального титра вируса КЧС, детектируемого ОТ-ПЦР-РВ в $0,23 \text{ Ig ККИД}_{50}/\text{см}^3$ для штаммов «719», «684» и «Ши-мынь».

Как представлено в таблице 3, сравнительный анализ параллельных исследований штаммов вируса разными тест-системами на основе ОТ-ПЦР-РВ показал, что предел детекции штамма «684» разработанным методом был на 1,2 Ig выше, чем у тест-систем № x1 и x2, а предел детекции референтного штамма «Ши-мынь» был на 2,0 Ig выше, чем у тест-системы № x2. При исследовании образца штамма «719» с титром $7,5 \text{ Ig ККИД}_{50}/\text{см}^3$ валидируемым методом получены положительные результаты, в то время как параллельное испытание образца тест-системами № x1 и x2 привело к сомнительным результатам.

С учетом всех полученных результатов Ct ($n = 3$) и 10-кратного разведения образца штамма вируса КЧС «719» построен график корреляции (рис. 3).

С помощью корреляционного анализа вычислены высокие статистические параметры, а именно: эффективность реакции $E = 105\%$, коэффициент адекватности $R^2 = 0,9928$ и критерий значимости $p \text{ value} < 0,0001$, что обуславливает перспективность использования ОТ-ПЦР-РВ в дальнейшей разработке количественной ПЦР со стандартными образцами.

Оценка аналитической специфичности. Образцы, содержащие геном гетерологичных вирусов и бактерий (возбудителей АЧС, болезней Ауески, РРСС, рожи свиней и ВД КРС), показали в ОТ-ПЦР-РВ отрицательный результат, а образцы, содержащие штаммы вируса КЧС, – положительный результат на наличие РНК вируса КЧС, соответственно аналитическая специфичность равна 100% (табл. 4).

Установлено, что при высоком показателе Ct на канале Green (геном вируса КЧС) возможна ингибция амплификации фрагмента ВКО, что может быть связано с расходом компонентов реакционной смеси (дезоксирибонуклеотидтрифосфатов, ДНК-полимеразы и др.) на синтез целевого ПЦР-продукта с большим числом копий матрицы [20]. Это обстоятельство необходимо учитывать при интерпретации результатов.

Определение диагностической чувствительности и специфичности. Все 27 истинно положительных образцов, содержащих вирус КЧС и полученных

Таблица 1
Результаты титрования ВКО в ОТ-ПЦР-РВ при использовании образцов различных материалов

Table 1
Results of internal control sample (ICS) titration with real-time RT-PCR using samples of different types

Образец	Титр ВКО (БОЕ/на реакцию)	Ct/ Green	Ct/ Crimson
ОКО	10^5	–	20,22
Интактная культура клеток ТС		–	26,02
10%-я суспензия селезенки свободной от КЧС свиньи		–	–
10%-я суспензия селезенки инфицированной вирусом КЧС свиньи		14,28	–
Вирусодержащая суспензия штамма «719» возбудителя КЧС		6,15	–
ОКО	$3,2 \times 10^5$	–	19,85
Интактная культура клеток ТС		–	25,67
10%-я суспензия селезенки свободной от КЧС свиньи		–	22,80
10%-я суспензия селезенки инфицированной вирусом КЧС свиньи		13,62	23,22
Вирусодержащая суспензия штамма «719» возбудителя КЧС		5,66	–
ОКО	10^6	–	14,11
Интактная культура клеток ТС		–	15,93
10%-я суспензия селезенки свободной от КЧС свиньи		–	17,90
10%-я суспензия селезенки инфицированной вирусом КЧС свиньи		15,12	14,73
Вирусодержащая суспензия штамма «719» возбудителя КЧС		5,95	26,07
ОКО	$3,2 \times 10^6$	–	11,70
Интактная культура клеток ТС		–	13,21
10%-я суспензия селезенки свободной от КЧС свиньи		–	15,21
10%-я суспензия селезенки инфицированной вирусом КЧС свиньи		12,10	10,48
Вирусодержащая суспензия штамма «719» возбудителя КЧС		5,56	24,25
ОКО	10^7	–	12,34
Интактная культура клеток ТС		–	17,82
10%-я суспензия селезенки свободной от КЧС свиньи		–	11,93
10%-я суспензия селезенки инфицированной вирусом КЧС свиньи		14,43	–
Вирусодержащая суспензия штамма «719» возбудителя КЧС		8,37	–

«–» – отрицательный результат (negative result); БОЕ – бляшкообразующая единица (plaque forming unit); Ct/Green – пороговое значение для детекции генома вируса КЧС (cycle threshold value for CSF virus genome detection); Ct/Crimson – пороговое значение для детекции ВКО (cycle threshold value for ICS detection).

Таблица 2

Показатели правильности, сходимости и воспроизводимости метода ОТ-ПЦР-РВ

Table 2

Developed real-time RT-PCR assay accuracy, repeatability and reproducibility values

Правильность					
Образец	Ct/Green	(среднее значение ± SD)	Ct/Crimson		
Штамм «719»	5,31	5,32 ± 0,148	–		
Штамм «719»	5,22		27,29		
Штамм «719»	5,30		26,01		
Штамм «719»	5,52		27,27		
Штамм «719»	5,33		26,67		
Штамм «719»	5,28		29,37		
Сходимость					
Порядок постановки реакции	Ct/Green	(среднее значение ± SD)	Ct/Crimson		
Первая постановка	5,38	5,64 ± 0,237	28,63		
Первая постановка	5,74		26,85		
Первая постановка	5,71		22,68		
Первая постановка	5,61		23,78		
Первая постановка	5,59		23,87		
Первая постановка	5,86		24,41		
Вторая постановка	5,63		5,44 ± 0,493	23,14	
Вторая постановка	5,37	23,95			
Вторая постановка	5,02	23,62			
Вторая постановка	5,11	23,11			
Вторая постановка	5,96	23,01			
Вторая постановка	5,56	23,70			
Третья постановка	5,59	5,60 ± 0,095		28,84	
Третья постановка	5,60		30,30		
Третья постановка	5,58		28,72		
Третья постановка	5,74		30,26		
Третья постановка	5,57		28,06		
Третья постановка	5,57		28,87		
Воспроизводимость (Ct/Green)					
1-й день		2-й день		3-й день	
первый исследователь	второй исследователь	первый исследователь	второй исследователь	первый исследователь	второй исследователь
5,52	5,07	5,67	6,51	7,83	8,95
5,27	5,10	5,61	4,70	8,01	9,19
5,46	5,82	5,65	4,55	6,71	9,17
5,42	5,98	5,64	5,14	8,28	8,98
5,38	5,33	5,73	5,44	8,02	9,30
5,46	5,06	5,78	5,49	9,21	9,34
5,4183 ± 0,125	5,3933 ± 0,591	5,68 ± 0,0917	5,305 ± 1,019	8,01 ± 1,166	9,155 ± 0,233

«–» – отрицательный результат (negative result); Ct/Green – значение для фрагмента вируса КЧС (cycle threshold value for CSF virus fragment);

Ct/Crimson – значение для фрагмента ВКО (cycle threshold value for ICS fragment).

от экспериментально инфицированных эпизоотическим штаммом свиней, а также пробы контаминированного инфицированными животными корма в ОТ-ПЦР-РВ продемонстрировали положительный результат на наличие генома вируса КЧС. Аналогично все 27 истинно отрицательных проб показали отсутствие РНК вируса КЧС (рис. 4).

Таким образом, при проведении испытаний показатели диагностической чувствительности и специфичности представленного метода были максимально возможными и составили 100%. При этом положи-

тельный образец крови, полученный от экспериментально инфицированных эпизоотическим штаммом свиней, а также положительный образец корма, отобранный в виварном комплексе, где содержались экспериментально зараженные тем же штаммом свиньи, тест-системой № x2 на основе ОТ-ПЦР-РВ выявлены не были, при этом данная проба крови не была выявлена и тест-системой № x1, что указывает на более низкую диагностическую чувствительность (92,6% для тест-системы № x2 и 96,3% для тест-системы № x1), чем у валидируемого метода.

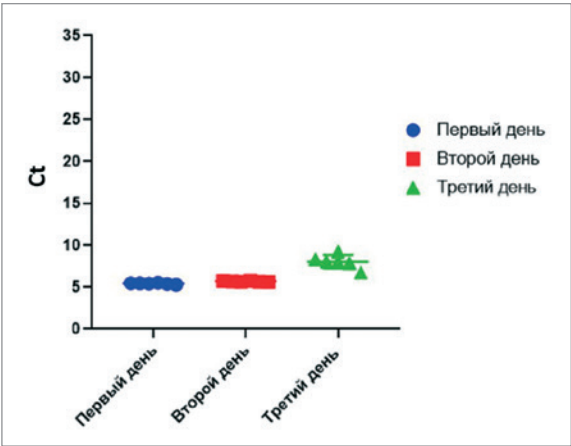


Рис. 2. Распределение показателей Ct для заведомо положительного образца в разные дни исследования при оценке воспроизводимости метода ОТ-ПЦР-РВ

Fig. 2. Distribution of Ct values for known positive sample in different days of testing when the real-time RT-PCR assay was assessed for its reproducibility

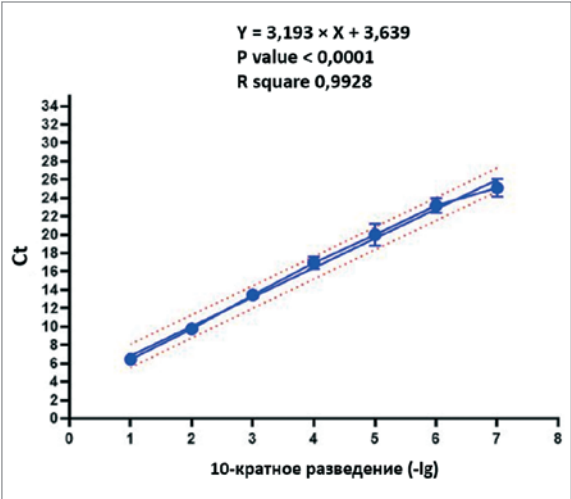


Рис. 3. График линейной корреляции разведений вируса КЧС штамма «719» с показателями Ct

Fig. 3. Graph of linear correlation of CSF virus “719” strain dilutions with Ct-values

Анализ и интерпретация результатов. Рекомендуемые параметры ПЦР-анализа для каналов Green и Crimson таковы: установка динамического фона, корректировка уклона, устранение выбросов на 10%, линейная шкала и пороговое значение, которое составляет 0,05. Результаты интерпретируются на основании наличия или отсутствия пересечения стандартной кривой с установленной пороговой линией, что соответствует наличию или отсутствию значения Ct в соответствующей графе таблицы результатов (рис. 5). Также с целью установления параметров ПЦР-анализа и определения максимального Ct, при котором образец может интерпретироваться как положительный, проведено исследование двукратного разведения РНК, экстрагированной из суспензии вируса КЧС штамма «719» с итоговым титром 7,5 lg ККИД₅₀/см³ (табл. 5). Полученные данные показали, что максимальное значение Ct составило 27,83, что эквивалентно титру вируса КЧС штамма «719» 0,23 lg ККИД₅₀/см³.

Таблица 3
Результаты ОТ-ПЦР-РВ при 10-кратных разведениях культурального материала различных эпизоотических штаммов вируса КЧС

Table 3
Real-time RT-PCR results for 10-fold dilutions of various epizootic CSF virus strains

Разведение вируса	Штамм «Ши-мынь» (титр 4,0 lg ККИД ₅₀ /см ³)	Штамм «719» (титр 7,5 lg ККИД ₅₀ /см ³)	Штамм «684» (титр 6,2 lg ККИД ₅₀ /см ³)
	Ct/Green	Ct/Green	Ct/Green
Исходный материал	11,88 (пол.)	5,41 (пол.)	6,79 (пол.)
1:10 ¹	16,18 (пол.)	9,75 (пол.)	9,89 (пол.)
1:10 ²	20,52 (пол.)	12,53 (пол.)	13,69 (пол.)
1:10 ³	22,64 (пол.)	16,68 (пол.)	16,97 (пол.)
1:10 ⁴	27,06 (пол.)	18,79 (пол.)	20,24 (пол.)
1:10 ⁵	—	20,60 (пол.)	23,45 (пол.)
1:10 ⁶	—	21,57 (пол.)	26,30 (пол.)
1:10 ⁷	—	24,71 (пол.)	—
1:10 ⁸	—	—	—

Тест-система № x1			
Ct/Yellow (результат)			
Исходный материал	12,89 (пол.)	6,44 (пол.)	8,27 (пол.)
1:10 ¹	16,77 (пол.)	8,33 (пол.)	12,89 (пол.)
1:10 ²	18,67 (пол.)	13,56 (пол.)	15,08 (пол.)
1:10 ³	21,96 (пол.)	17,67 (пол.)	17,36 (пол.)
1:10 ⁴	25,78 (пол.)	18,82 (пол.)	22,85 (пол.)
1:10 ⁵	—	24,01 (пол.)	26,57 (сомнит.)
1:10 ⁶	—	22,79 (пол.)	—
1:10 ⁷	—	28,19 (сомнит.)	—
1:10 ⁸	—	—	—

Тест-система № x2			
Ct/Yellow (результат)			
Исходный материал	19,07 (пол.)	10,60 (пол.)	9,37 (пол.)
1:10 ¹	22,42 (пол.)	13,34 (пол.)	12,69 (пол.)
1:10 ²	25,28 (пол.)	16,46 (пол.)	16,13 (пол.)
1:10 ³	—	17,67 (пол.)	19,19 (пол.)
1:10 ⁴	—	20,55 (пол.)	22,22 (пол.)
1:10 ⁵	—	22,55 (пол.)	24,68 (пол.)
1:10 ⁶	—	25,44 (пол.)	—
1:10 ⁷	—	28,02 (сомнит.)	—
1:10 ⁸	—	—	—

«—» – отрицательный результат (negative result); пол. – положительный результат (positive result); сомнит. – сомнительный результат (inconclusive result); Ct/Green – значение для фрагмента вируса КЧС (cycle threshold value for CSF virus fragment); Ct/Yellow – значение для фрагмента вируса КЧС, полученное с использованием тест-систем № x1 и x2 на основе ПЦР-РВ согласно инструкции производителя (cycle threshold value for CSF virus fragment obtained when real-time PCR-based test systems No. x1 and x2 were used in accordance with their manufactures' instructions).

Таблица 4

Определение аналитической специфичности на наличие генома вируса КЧС в ОТ-ПЦР-РВ ($n = 2$)

Table 4

Assessment of analytical specificity of the real-time RT-PCR assay when the assay was used for CSF virus genome detection ($n = 2$)

Характеристика образца	Ct/Green	Ct/Crimson	Результат на наличие генома вируса КЧС
Полевой изолят <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	–	19,08	отрицательный
Штамм «Иркутский 2007» вируса РРСС	–	13,03	отрицательный
Штамм «ВК»-ДЕП вируса болезни Ауески	–	13,73	отрицательный
Штамм «Мозамбик-78» вируса АЧС	–	15,39	отрицательный
Изолят «Челябинск 2021» возбудителя ВД КРС	–	15,31	отрицательный
Референс-штамм вируса КЧС «Ши-мынь»	18,64	15,39	положительный
Штамм вируса КЧС «CSF Amur 19-10/WB-12555»	12,19	16,88	положительный
Штамм вируса КЧС «CSF Tigrovoe 16/WB-634»	17,26	18,02	положительный
Штамм вируса КЧС «275»	11,27	–	положительный
Штамм вируса КЧС «719»	6,56	–	положительный
Штамм вируса КЧС «843»	6,27	–	положительный
Штамм вируса КЧС «917»	6,24	–	положительный
Штамм вируса КЧС «918»	21,8	16,7	положительный
Штамм вируса КЧС «920»	21,16	14,88	положительный
Штамм вируса КЧС «926»	14,12	16,07	положительный
Штамм вируса КЧС «927»	13,61	17,91	положительный
Штамм вируса КЧС «930»	27,25	14,61	положительный
Штамм вируса КЧС «368»	10,01	19,04	положительный
Штамм вируса КЧС «589»	11,81	19,81	положительный
Штамм вируса КЧС «684»	6,79	17,15	положительный
Штамм вируса КЧС «870»	9,64	18,45	положительный
Штамм вируса КЧС «924»	13,26	18,89	положительный
Штамм вируса КЧС «925»	13,93	17,04	положительный
Штамм вируса КЧС «929»	15,28	19,12	положительный
ОКО	–	15,17	отрицательный
ПКО (вакцинный штамм вируса КЧС «СК»)	19,57	18,76	положительный

«–» – отрицательный результат (negative result); Ct/Green – значение для фрагмента вируса КЧС (cycle threshold value for CSF virus fragment); Ct/Crimson – значение для фрагмента ВКО (cycle threshold value for ICS fragment).

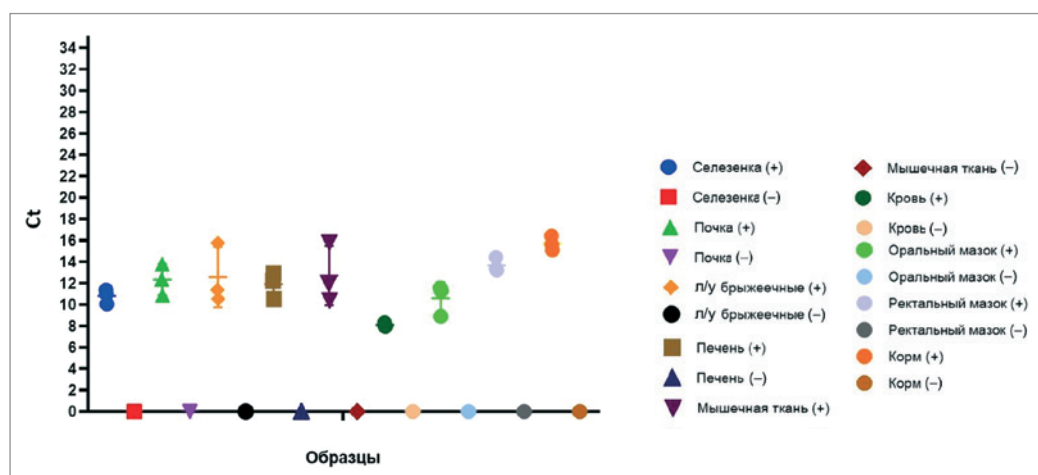


Рис. 4. Кинетика значений Ct для панели образцов, выбранной с целью определения диагностической чувствительности и специфичности (образцы – 10%-е суспензии указанных органов; «+» – истинно положительная проба; «–» – истинно отрицательная проба; л/у – лимфоузлы; в качестве отрицательных образцов мышечной ткани использованы мясное сырье и изделия свиного происхождения)

Fig. 4. Kinetics of Ct values for the panel of samples selected for determination of diagnostic sensitivity and specificity (samples – 10% suspensions of the indicated organs; «+» – true positive sample; «–» – true negative sample; l/n – lymph nodes; porcine raw meats and products were used as negative muscle samples)

Таблица 5

Результаты ОТ-ПЦР-РВ при двоичных разведениях РНК вируса КЧС

Table 5

Real-time RT-PCR results for two-fold dilutions of CSF virus RNA

Разведение РНК вируса КЧС	Ct/Green
Исходный материал	6,04
1:2 ¹	6,86
1:2 ²	7,55
1:2 ³	8,75
1:2 ⁴	12,02
1:2 ⁵	11,75
1:2 ⁶	12,06
1:2 ⁷	12,90
1:2 ⁸	13,42
1:2 ⁹	14,61
1:2 ¹⁰	15,61
1:2 ¹¹	16,32
1:2 ¹²	17,19
1:2 ¹³	18,21
1:2 ¹⁴	19,27
1:2 ¹⁵	20,14
1:2 ¹⁶	21,17
1:2 ¹⁷	22,08
1:2 ¹⁸	22,98
1:2 ¹⁹	24,06
1:2 ²⁰	24,74
1:2 ²¹	24,22
1:2 ²²	26,13
1:2 ²³	26,18
1:2 ²⁴	27,83
1:2 ²⁵	27,01
1:2 ²⁶	–
1:2 ²⁷	–
1:2 ²⁸	–
1:2 ²⁹	–
1:2 ³⁰	–

РНК вируса КЧС экстрагирована из вирусосодержащей суспензии вируса КЧС штамма «719» с титром 7,5 lg ККИД₅₀/см³ (CSF virus RNA was extracted from CSF virus “719” strain-containing suspension; titre 7.5 lg CCID₅₀/cm³); «–» – отрицательный результат (negative result).

Результат считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей реакции.

Образец считается положительным на наличие генома вируса КЧС, если значение Ct на канале Green не превышает 28. Результат в таком случае является валидным вне зависимости показателей на канале Crimson.

Отрицательный результат на наличие генома вируса КЧС интерпретируют, если значение Ct на канале Green отсутствует, но на канале Crimson Ct не превышает 31.

Сомнительным является результат ПЦР при условии превышения 28 значения Ct на канале Green при значении Ct на канале Crimson менее 31.

При отсутствии значений Ct на каналах Green и Crimson, а также при превышении Ct более 31 на Crimson результат ПЦР является невалидным.

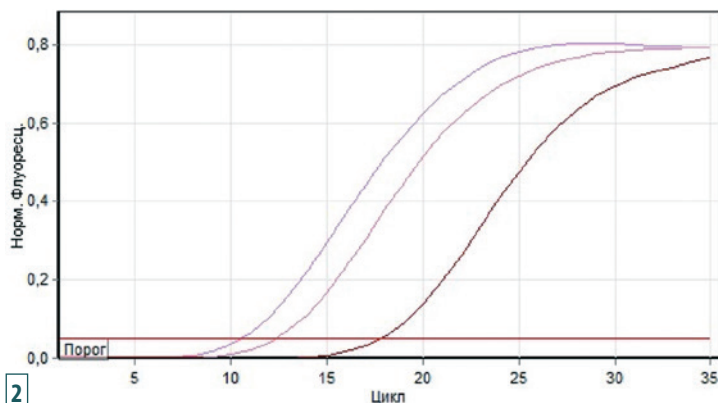
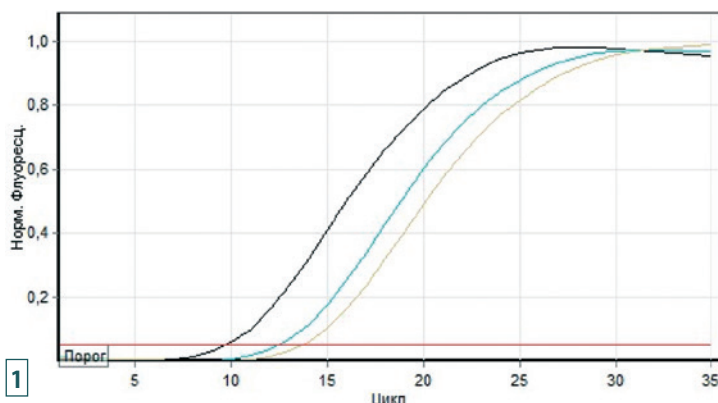


Рис. 5. Кривые флуоресценции: 1 – на канал Green (фрагмент вируса КЧС); 2 – на канал Crimson (фрагмент ВКО)

Fig. 5. Fluorescence curves: 1 – for Green channel (CSF virus fragment); 2 – for Crimson channel (ICS fragment)

В случае сомнительного или невалидного результата необходимо провести повторное исследование пробы начиная с этапа выделения РНК с целью подтвердить или опровергнуть наличие генома вируса КЧС в данном образце.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанный метод обладает высокими валидационными характеристиками: 100%-ми показателями правильности, сходимости, воспроизводимости, аналитической специфичности, диагностической чувствительности и специфичности, пределом детекции 0,23 lg ККИД₅₀/см³. Такие параметры делают предложенный метод ОТ-ПЦР-РВ конкурентоспособным на отечественном рынке диагностик и пригодным для использования в широкомасштабном мониторинге эпизоотической ситуации по КЧС в России.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Malik Y. S., Bhat S., Kumar O. R. V., Yadav A. K., Sircar S., Ansari M. I., et al. Classical swine fever virus biology, clinicopathology, diagnosis, vaccines and a meta-analysis of prevalence: A review from the Indian perspective. *Pathogens*. 2020; 9 (6):500. <https://doi.org/10.3390/pathogens9060500>
2. Stark R., Meyers G., Rümenapf T., Thiel H. J. Processing of pestivirus polyprotein: cleavage site between autoprotease and nucleocapsid protein of classical swine fever virus. *Journal of Virology*. 1993; 67 (12): 7088–7095. <https://doi.org/10.1128/jvi.67.12.7088-7095.1993>
3. Blome S., Staubach C., Henke J., Carlson J., Beer M. Classical swine fever – an updated review. *Viruses*. 2017; 9 (4):86. <https://doi.org/10.3390/v9040086>
4. Edwards S., Fukusho A., Lefèvre P.-C., Lipowski A., Pejsak Z., Roehre P., Westergaard J. Classical swine fever: the global situation. *Veterinary Microbiology*. 2000; 73 (2–3): 103–119. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(00\)00138-3](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(00)00138-3)

5. Оганесян А. С., Шевцов А. А., Щербаков А. В., Коренной Ф. И., Караулов А. К. Классическая чума свиней: ретроспективный анализ эпизоотической ситуации в Российской Федерации (2007–2021 гг.) и прогноз на 2022 г. *Ветеринария сегодня*. 2022; 11 (3): 229–238. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2022-11-3-229-238>
6. Шевцов А. Классическая чума свиней: перспективы искоренения. *Животноводство России*. 2021; (10): 27–30. <https://www.elibrary.ru/jfxalo>
7. Zhu H., Zhang H., Xu Y., Laššáková S., Korabečná M., Neužil P. PCR past, present and future. *BioTechniques*. 2020; 69 (4): 317–325. <https://doi.org/10.2144/btn-2020-0057>
8. Hirschhorn J. W., Avery A., Schandl C. A. Managing a PCR contamination event in a molecular pathology laboratory. In: *Clinical Applications of Nucleic Acid Amplification. Methods in Molecular Biology*. Eds. M. B. Myers, C. A. Schandl. 2023; 2621: 15–26. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2950-5_2
9. Canal C. W., Hotzel I., de Almeida L. L., Roehe P. M., Masuda A. Differentiation of classical swine fever virus from ruminant pestiviruses by reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR). *Veterinary Microbiology*. 1996; 48 (3–4): 373–379. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(95\)00156-5](https://doi.org/10.1016/0378-1135(95)00156-5)
10. McGoldrick A., Lowings J. P., Ibata G., Sands J. J., Belak S., Paton D. J. A novel approach to the detection of classical swine fever virus by RT-PCR with a fluorogenic probe (TaqMan). *Journal of Virological Methods*. 1998; 72 (2): 125–135. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(97\)00208-5](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(97)00208-5)
11. Hoffmann B., Beer M., Schelp C., Schirmer H., Depner K. Validation of a real-time RT-PCR assay for sensitive and specific detection of classical swine fever. *Journal of Virological Methods*. 2005; 130 (1–2): 36–44. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.05.030>
12. Latorra D., Arar K., Hurley J. M. Design considerations and effects of LNA in PCR primers. *Molecular and Cellular Probes*. 2003; 17 (5): 253–259. [https://doi.org/10.1016/S0890-8508\(03\)00062-8](https://doi.org/10.1016/S0890-8508(03)00062-8)
13. Monpoeho S., Coste-Burel M., Costa-Mattioli M., Besse B., Chomel J., Billaudel S., Ferre V. Application of a real-time polymerase chain reaction with internal positive control for detection and quantification of enterovirus in cerebrospinal fluid. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2002; 21 (7): 532–536. <https://doi.org/10.1007/s10096-002-0766-5>
14. Гаврилова В. Л., Пузанкова О. С., Латышев О. Е., Иголкин А. С., Манин Б. Л., Жбанова Т. В., Южаков А. Г. Изучение культуральных и молекулярных свойств изолятов вируса классической чумы свиней, выделенных в 2016 году. *Труды Федерального центра охраны здоровья животных*. 2017; 15: 82–101. <https://www.elibrary.ru/xdrdb>
15. Гилеп А. А., Башко Н. П., Усанов С. А., Камышников В. С. Импорт-замещающие и экспорт-ориентированные отечественные диагностические средства. *Лабораторная диагностика. Восточная Европа*. 2014; (4): 28–45. <https://elibrary.ru/taxthg>
16. Колбин И. С., Иголкин А. С., Гаврилова В. Л., Пузанкова О. С., Аронова Е. В., Елсукова А. А., Власова Н. Н. Определение репродуктивных свойств вируса классической чумы свиней вирулентных и вакцинных штаммов в первичных и перевиваемых культурах клеток. *Ветеринария сегодня*. 2022; 11 (2): 149–155. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2022-11-2-149-155>
17. Dreier J., Störmer M., Kleesiek K. Use of bacteriophage MS2 as an internal control in viral reverse transcription-PCR assays. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005; 43 (9): 4551–4557. <https://doi.org/10.1128/jcm.43.9.4551-4557.2005>
18. O'Connell K. P., Bucher J. R., Anderson P. E., Cao C. J., Khan A. S., Gostomski M. V., Valdes J. J. Real-time fluorogenic reverse transcription-PCR assays for detection of bacteriophage MS2. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006; 72 (1): 478–483. <https://doi.org/10.1128/aem.72.1.478-483.2006>
19. Bustin S. A., Benes V., Garson J. A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., et al. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*. 2009; 55 (4): 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
20. Buckwalter S. P., Sloan L. M., Cunningham S. A., Espy M. J., Uhl J. R., Jones M. F., et al. Inhibition controls for qualitative real-time PCR assays: Are they necessary for all specimen matrices? *Journal of Clinical Microbiology*. 2014; 52 (6): 2139–2143. <https://doi.org/10.1128/jcm.03389-13>
21. Zambenedetti M. R., Pavoni D. P., Dallabona A. C., Dominguez A. C., Poersch C. de D., Fragoso S. P., Krieger M. A. Internal control for real-time polymerase chain reaction based on MS2 bacteriophage for RNA viruses diagnostics. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2017; 112 (5): 339–347. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160380>
22. Indian perspective. *Pathogens*. 2020; 9 (6):500. <https://doi.org/10.3390/pathogens9060500>
23. Stark R., Meyers G., Rümenapf T., Thiel H. J. Processing of pestivirus polyprotein: cleavage site between autoprotease and nucleocapsid protein of classical swine fever virus. *Journal of Virology*. 1993; 67 (12): 7088–7095. <https://doi.org/10.1128/jvi.67.12.7088-7095.1993>
24. Blome S., Staubach C., Henke J., Carlson J., Beer M. Classical swine fever – an updated review. *Viruses*. 2017; 9 (4):86. <https://doi.org/10.3390/v9040086>
25. Edwards S., Fukusho A., Lefèvre P.-C., Lipowski A., Pejsak Z., Roehe P., Westergaard J. Classical swine fever: the global situation. *Veterinary Microbiology*. 2000; 73 (2–3): 103–119. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00138-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00138-3)
26. Oganessian A. S., Shevtsov A. A., Shcherbakov A. V., Korennoy F. I., Karaulov A. K. Classical swine fever: a retrospective analysis of the epizootic situation in the Russian Federation (2007–2021) and forecast for 2022. *Veterinary Science Today*. 2022; 11 (3): 229–238. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2022-11-3-229-238>
27. Shevtsov A. Classical swine fever: prospects of eradication. *Animal Husbandry of Russia*. 2021; (10): 27–30. <https://www.elibrary.ru/jfxalo> (in Russ.)
28. Zhu H., Zhang H., Xu Y., Laššáková S., Korabečná M., Neužil P. PCR past, present and future. *BioTechniques*. 2020; 69 (4): 317–325. <https://doi.org/10.2144/btn-2020-0057>
29. Hirschhorn J. W., Avery A., Schandl C. A. Managing a PCR contamination event in a molecular pathology laboratory. In: *Clinical Applications of Nucleic Acid Amplification. Methods in Molecular Biology*. Eds. M. B. Myers, C. A. Schandl. 2023; 2621: 15–26. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2950-5_2
30. Canal C. W., Hotzel I., de Almeida L. L., Roehe P. M., Masuda A. Differentiation of classical swine fever virus from ruminant pestiviruses by reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR). *Veterinary Microbiology*. 1996; 48 (3–4): 373–379. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(95\)00156-5](https://doi.org/10.1016/0378-1135(95)00156-5)
31. McGoldrick A., Lowings J. P., Ibata G., Sands J. J., Belak S., Paton D. J. A novel approach to the detection of classical swine fever virus by RT-PCR with a fluorogenic probe (TaqMan). *Journal of Virological Methods*. 1998; 72 (2): 125–135. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(97\)00208-5](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(97)00208-5)
32. Hoffmann B., Beer M., Schelp C., Schirmer H., Depner K. Validation of a real-time RT-PCR assay for sensitive and specific detection of classical swine fever. *Journal of Virological Methods*. 2005; 130 (1–2): 36–44. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.05.030>
33. Latorra D., Arar K., Hurley J. M. Design considerations and effects of LNA in PCR primers. *Molecular and Cellular Probes*. 2003; 17 (5): 253–259. [https://doi.org/10.1016/S0890-8508\(03\)00062-8](https://doi.org/10.1016/S0890-8508(03)00062-8)
34. Monpoeho S., Coste-Burel M., Costa-Mattioli M., Besse B., Chomel J., Billaudel S., Ferre V. Application of a real-time polymerase chain reaction with internal positive control for detection and quantification of enterovirus in cerebrospinal fluid. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2002; 21 (7): 532–536. <https://doi.org/10.1007/s10096-002-0766-5>
35. Gavrilo V. L., Puzankova O. S., Latyshev O. Ye., Igolkin A. S., Manin B. L., Zhabanova T. V., Yuzhakov A. G. Studying cultural and molecular characteristics of classical swine fever virus isolates recovered in 2016. *Proceedings of the Federal Centre for Animal Health*. 2017; 15: 82–101. <https://www.elibrary.ru/xdrdb> (in Russ.)
36. Gilep A., Bashko N., Usanov S., Kamysnikov V. Import-substituting domestic diagnostic tools. *Laboratory Diagnostics. Eastern Europe*. 2014; (4): 28–45. <https://elibrary.ru/taxthg> (in Russ.)
37. Kolbin I. S., Igolkin A. S., Gavrilo V. L., Puzankova O. S., Aronova Ye. V., Yelsukova A. A., Vlasova N. N. Determination of reproductive properties of virulent and vaccine classical swine fever virus strains in primary and continuous cell cultures. *Veterinary Science Today*. 2022; 11 (2): 149–155. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2022-11-2-149-155>
38. Dreier J., Störmer M., Kleesiek K. Use of bacteriophage MS2 as an internal control in viral reverse transcription-PCR assays. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005; 43 (9): 4551–4557. <https://doi.org/10.1128/jcm.43.9.4551-4557.2005>
39. O'Connell K. P., Bucher J. R., Anderson P. E., Cao C. J., Khan A. S., Gostomski M. V., Valdes J. J. Real-time fluorogenic reverse transcription-PCR assays for detection of bacteriophage MS2. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006; 72 (1): 478–483. <https://doi.org/10.1128/aem.72.1.478-483.2006>
40. Bustin S. A., Benes V., Garson J. A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., et al. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*. 2009; 55 (4): 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
41. Buckwalter S. P., Sloan L. M., Cunningham S. A., Espy M. J., Uhl J. R., Jones M. F., et al. Inhibition controls for qualitative real-time

REFERENCES

PCR assays: Are they necessary for all specimen matrices? *Journal of Clinical Microbiology*. 2014; 52 (6): 2139–2143. <https://doi.org/10.1128/jcm.03389-13>

21. Zambenedetti M. R., Pavoni D. P., Dallabona A. C., Dominguez A. C., Poersch C. de D., Frago S. P., Krieger M. A. Internal control for real-time polymerase chain reaction based on MS2 bacteriophage for RNA viruses

diagnostics. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2017; 112 (5): 339–347. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160380>

Поступила в редакцию / Received 12.04.2024

Поступила после рецензирования / Revised 28.05.2024

Принята к публикации / Accepted 12.08.2024

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Садчикова Анастасия Сергеевна, аспирант, ветеринарный врач референтной лаборатории по африканской чуме свиней ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия;

<https://orcid.org/0009-0001-0801-2394>, sadchikova@arriah.ru

Иголкин Алексей Сергеевич, канд. вет. наук, заведующий референтной лабораторией по африканской чуме свиней ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия;

<https://orcid.org/0000-0002-5438-8026>, igolkin_as@arriah.ru

Чернышев Роман Сергеевич, аспирант, ветеринарный врач референтной лаборатории по африканской чуме свиней ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия;

<https://orcid.org/0000-0003-3604-7161>, chernishev_rs@arriah.ru

Козлов Антон Александрович, канд. биол. наук, научный сотрудник референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия;

<https://orcid.org/0000-0002-1466-7602>, kozlov_aa@arriah.ru

Колбин Иван Сергеевич, ветеринарный врач референтной лаборатории по африканской чуме свиней ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0003-4692-1297>, kolbin@arriah.ru

Спрыгин Александр Владимирович, д-р биол. наук, старший научный сотрудник референтной лаборатории болезней крупного рогатого скота, заведующий лабораторией молекулярных и генетических исследований ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-1659-3256>, sprygin@arriah.ru

Бирюченков Дмитрий Анатольевич, канд. вет. наук, заведующий лабораторией профилактики болезней свиней ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия;

<https://orcid.org/0000-0002-4057-2367>, biruchenkov@arriah.ru

Чвала Илья Александрович, канд. вет. наук, заместитель директора по НИР ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0001-5982-3675>, chvala@arriah.ru

Мазлум Али, канд. биол. наук, Университет штата Луизиана, г. Батон-Руж, США; <https://orcid.org/0000-0002-5982-8393>, ali.mazloun6@gmail.com

Anastasiya S. Sadchikova, Postgraduate Student, Veterinarian, Reference Laboratory for African Swine Fever, Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia;

<https://orcid.org/0009-0001-0801-2394>, sadchikova@arriah.ru

Alexey S. Igolkin, Cand. Sci. (Veterinary Medicine), Head of Reference Laboratory for African Swine Fever, Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia;

<https://orcid.org/0000-0002-5438-8026>, igolkin_as@arriah.ru

Roman S. Chernyshev, Postgraduate Student, Veterinarian, Reference Laboratory for African Swine Fever, Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia;

<https://orcid.org/0000-0003-3604-7161>, chernishev_rs@arriah.ru

Anton A. Kozlov, Cand. Sci. (Biology), Researcher, Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-1466-7602>, kozlov_aa@arriah.ru

Ivan S. Kolbin, Veterinarian, Reference Laboratory for African Swine Fever, Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-4692-1297>, kolbin@arriah.ru

Alexander V. Sprygin, Dr. Sci. (Biology), Senior Researcher, Reference Laboratory for Bovine Diseases, Head of Molecular and Genetic Research Laboratory, Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-1659-3256>, sprygin@arriah.ru

Dmitriy A. Biryuchenkov, Cand. Sci. (Veterinary Medicine), Head of Laboratory for Porcine Prevention, Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-4057-2367>, biruchenkov@arriah.ru

Ilya A. Chvala, Cand. Sci. (Veterinary Medicine), Deputy Director for Research, Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-5982-3675>, chvala@arriah.ru

Ali Mazloun, Cand. Sci. (Biology), Louisiana State University, Baton Rouge, USA; <https://orcid.org/0000-0002-5982-8393>, ali.mazloun6@gmail.com

Вклад авторов: Садчикова А. С. – разработка и валидация метода, подготовка текста статьи; Иголкин А. С. – научное руководство, редактирование статьи; Чернышев Р. С. – валидация метода, подготовка текста статьи; Козлов А. А. – разработка системы ВКО; Колбин И. С. – разработка метода; Спрыгин А. В. – дизайн праймеров, редактирование статьи; Бирюченков Д. А. – консультативная помощь; Чвала И. А. – консультативная помощь; Мазлум А. – концепт и дизайн исследования, научное руководство, редактирование статьи.

Contribution: Sadchikova A. S. – assay development and validation, paper text preparation; Igolkin A. S. – scientific supervision, paper editing; Chernyshev R. S. – assay validation, paper text preparation; Kozlov A. A. – designing of internal control sample (ICS); Kolbin I. S. – assay development; Sprygin A. V. – designing of primers, paper editing; Biryuchenkov D. A. – advisory assistance; Chvala I. A. – advisory assistance; Mazloun A. – study concept and design, scientific supervision, paper editing.